云 南 植 物 研 究 2008，30 (4)：489～495
Acta Botanica Yunnanica DOI：10.3724 SP.J.1143.2008.07265

超积累植物水蓼吸收锰的生理与分子机制*

王 华[1,2]，唐树梅[1**]，廖香俊[3]，曹启民[4]
(1 海南大学农学院，海南 儋州 571737；2 中国热带农业科学院香料饮料研究所，海南 万宁 571533；
3 海南省地质勘查局，海南 海口 570100；4 中山大学环境科学与工程学院，广东 广州 510275)

摘要：水蓼（*Polygonum hydropiper*）是一种新近发现的锰超积累植物。本文通过营养液模拟试验，研究了锰在水蓼细胞中的分布与化学形态特征，以及锰胁迫下水蓼的生理生化响应机制。结果表明：锰在水蓼叶片非活性代谢部分（细胞壁和液泡）的积累是其解毒耐锰的主要机制之一；水蓼叶片中的锰大部分以水溶性有机盐或草酸锰的形态存在；在锰浓度处理为 8 000 μmol/L时，叶绿素 a 含量显著降低，而在其它处理条件下，叶绿素 a无明显变化；在锰处理≤5 000 μmol/L 时水蓼叶片的细胞膜还没有受到明显伤害；水蓼叶片的可溶性蛋白含量随锰处理浓度不同而变化，说明植物在代谢和结构上发生了调整；随锰处理浓度的增加，水蓼叶片 SOD 和 POD 活性提高，保护酶活性的提高又可清除活性氧自由基，这是水蓼耐高锰和累积锰的一种生理响应机制。

关键词：水蓼；锰；超积累；分布；形态；生理响应
中图分类号：Q 945 **文献标识码**：A **文章编号**：0253-2700 (2008) 04-489-07

Physiological and Molecular Mechanisms of Mn Uptake by Hyperaccumulting Plant *Polygonum hydropiper* (Polygonaceae)

WANG Hua[1,2]，TANG Shu-Mei[1**]，LIAO Xiang-Jun[3]，CAO Qi-Min[4]
(1 *College of Agronomy*，*Hainan University*，Danzhou 571737，China；2 *Institute of Spice and Beverage Research*，*Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences*，Wanning 571533，China；3 *Bureau of Geological Exploration of Hainan Province*，Haikou 570100，China；4 *Shool of Environmental Science and Engineering*，*Sun Yat-Sen University*，Guangzhou 510275，China)

Abstract: *Polygonum hydropiper* was a new hyper-accumulated Mn plant. The experiments were carried out in order to find out subcellular distribution characteristics and chemical pattern of Mn in cell and the physiological and biochemical mechanisms of *Polygonum hydropiper* responding to Mn stress. The results indicated that the accumulation of Mn in the cell wall (accumulation rate as high as 36.34%) and the vacuole of the leaves (accumulation rate as high as 65.64%) might be one of the mechanisms of tolerance and hyperaccumulation of *Polygonum hydropiper* to Mn. Most Mn in leaves were the speciation of H_2O-solubility organic salts or manganese oxalates. The content of chlorophyll a did not change under different Mn concentration treatments except that its content decreased remarkably when Mn concentration was 8 000 μmol/L in solut ions. The membranes were not harmed by Mn when its concentration was less than 5 000 μmol/L in solutions; Under different Mn concentrations of Mn, the content of their soluble proteins of leaves had changed at some stage. The activity of SOD and POD were gradually improved with the increasing of Mn concentration, which could eliminate activated oxygen free radical, This might be the other physiological mechanism of tolerance and hyperaccumulation of *Polygonum hydropiper* responding to Mn.

Key words: *Polygonum hydropiper*; Mn; Hyperaccumulation; Distribution; Speciation; Physiological response

---

* 基金项目：国家科技部科技基础性工作和社会公益研究专项 (No.2004DIB3J073)
** 通讯作者：Author for correspondence; E-mail: tsm317@163.com; Tel: 0898-23300492
收稿日期：2007-11-08，2008-01-23 接受发表
作者简介：王华 (1983-) 女，硕士，研究实习员，主要从事重金属污染环境的植物修复工作。

植物修复（Phytoremediation）是近年来受到关注的高效、廉价的原位绿色修复技术，是解决环境中重金属污染问题很有前途的方法，而超积累植物（Hyperaccumulator）研究则是植物修复技术的核心问题。目前，国际上报道的超积累植物已有480多种，且大部分为Ni超积累植物，其中锰超积累植物相对较少，仅有14种。有关超积累植物吸收重金属的生理与分子机制的研究除了在Ni和Zn超积累植物的生理机制研究有所突破外，对其它重金属元素和植物种类的研究尚无较大进展。

水蓼（*Polygonum hydropiper* L.）是新近发现的一种Mn超积累植物，对Mn具有很强的富集能力（王华等，2007）。营养液培养试验结果表明，当营养液中锰的浓度为5 000 μmol/L时，水蓼叶锰含量为10 648.73 mg/kg，地上部富集系数高达19.41，且植株生长正常（王华等，2007）。水蓼的发现为Mn污染土壤和水体的植物修复提供了一种新的材料，而对水蓼超积累及耐性的研究则是植物修复技术走向实用化的基础，因此，对水蓼超积累的生理生化和分子机制的研究对于推动Mn污染环境的植物修复研究具有重要意义。

超积累植物在体内积累大量的重金属而不产生毒害现象，这是因为其自身存在一定的解毒机制，即重金属在植物体内以不具生物活性的解毒形式存在。如离子主动运输进入液泡，与有机酸或某些蛋白质的结合等，同时也可能是植物具有保护酶活性的机制，即使在高浓度重金属状况下仍能维持正常的代谢过程。本研究采用营养液培养的方法，研究了锰在水蓼细胞水平的分布和水蓼体内锰的主要存在形态，同时从生理响应的角度探讨了水蓼超积累锰的机理，试图为揭示超积累植物的超积累机制提供一定的理论基础。

1 材料与方法

1.1 植物材料处理

1.1.1 营养液培养法 供试植物：水蓼（采自于昌江石碌铁矿废弃堆积地）。

植物预培养：将植物材料用去离子水冲洗干净，剪成大小一致枝条，进行预培养，每4天更换一次营养液（Hoagland营养液配方），每天用0.1 mol/L NaOH或0.1 mol/L HCl调节营养液pH至5.8，保持24小时通气。为充分消除植株内锰的本底，待植株长到20 cm高时，截取上端5 cm长的带叶枝条进行第2次预培养，在枝条长出比较旺盛的根系之后，取生长一致的植株称取鲜重并开始锰处理。

1.1.2 锰在水蓼细胞中分布与化学形态的研究试验 设定4个处理，锰的浓度分别为9.1（CK）、500、2 000、5 000 μmol/L。锰以$MnSO_4 \cdot H_2O$形态加入，每个处理设3个重复，每天用0.1 mol/L NaOH或0.1 mol/L HCl调pH值至5.8，以维持生长介质中较高的Mn^{2+}浓度，保持连续通气，每4 d更换一次营养液，并保持体积不变，30 d后收获。

1.1.3 水蓼对锰毒害的生理生化响应机制试验 设定5个处理，锰的浓度分别为9.1（CK）、500、2 000、5 000、8 000 μmol/L。锰以$MnSO_4 \cdot H_2O$形态加入，每个处理设3个重复，每天用0.1 mol/L NaOH或0.1 mol/L HCl调pH值至5.8，以维持生长介质中较高的Mn^{2+}浓度，保持连续通气，每4 d更换一次营养液，并保持体积不变，在处理30 d后采摘叶片进行分析。

1.2 测定方法

细胞各部分的分离及锰含量测定按Weigel and Jager（1980）与Gabbrielli（1990）的方法操作；

植物体内锰的化学形态分析采用许嘉琳（1991）与杨居荣等（1995）的方法操作；

叶绿素的测定参照Cho and Park（1999）的方法操作；

质膜相对透性采用电导仪法（中国科学院上海植物生理研究所和上海市植物生理学会，1999）测定；

可溶性蛋白含量的测定按Bradford（1976）的方法操作；

SOD、CAT、POD的活性测定均参照Cao（2004）和方法。

1.3 数据处理

数据统计分析采用EXCEL和SAS软件。

2 结果

2.1 锰在水蓼细胞中分布与化学形态的研究

2.1.1 锰在水蓼细胞水平的分布 不同锰浓度处理下水蓼根细胞内Mn含量及分配率如表1所示。在根部随锰处理浓度的增加，细胞质可溶性物质、细胞壁和细胞器中结合的锰含量均增加，根中的总锰含量随培养液中锰的增加迅速增加，在处理浓度为5 000 μmol/L时，根中Mn的含量比对照增加了近58倍；从细胞内的分配比例来看，对照处理时，根中大部分锰分布在细胞质可溶性部分，占总锰的62.16%，随锰处理浓度的增加，细胞质可溶性部分锰含量减少，细胞壁结合的锰含量增加，在5 000 μmol/L锰处理时，细胞壁锰占总锰的61.22%，而此时细胞质可溶性

表 1　水蓼叶、茎和根细胞内 Mn 的分布

Table 1　Subcellular distribution of Mn in different organs of *Polygonum hydropiper*

	Mn treatment	F1	F2	F3	Total
	μmol L	mg kg FW			
root	9.1 (CK)	12.56±1.13a (25.36)	30.78±2.23a (62.16)	6.18±0.32 (12.48)	49.52±3.85
	500	180.16±9.62 (35.48)	289.15±20.33 (56.95)	38.43±2.46 (7.57)	507.74±39.43
	2000	936.13±50.29 (57.47)	613.96±35.18 (37.69)	78.69±5.11 (4.83)	1628.78±100.34
	5000	1758.76±120.47 (61.22)	993.46±78.93 (34.58)	120.84±9.46 (4.21)	2873.06±251.36
Stem	9.1 (CK)	21.48±1.17 (67.89)	6.12±0.25 (19.34)	4.04±0.15 (12.77)	31.64±2.69
	500	40.23±3.26 (66.61)	14.59±1.10 (24.16)	5.58±0.35 (9.24)	60.40±5.71
	2000	355.85±22.47 (45.38)	396.45±29.73 (50.55)	31.92±2.46 (4.07)	784.22±64.88
	5000	562.43±41.78 (37.12)	887.79±66.42 (58.59)	65.14±5.58 (4.30)	1515.36±100.10
Leaf	9.1 (CK)	29.36±1.99 (36.37)	47.01±3.58 (58.18)	4.43±0.30 (5.48)	80.80±6.28
	500	158.37±10.38 (34.51)	277.43±21.08 (60.45)	23.17±1.93 (5.05)	458.97±34.50
	2000	654.07±51.17 (33.16)	1266.98±100.04 (64.24)	51.35±3.88 (2.60)	1972.40±110.75
	5000	1118.82±93.41 (31.73)	2314.57±187.21 (65.64)	92.86±7.97 (2.63)	3526.25±296.87

注：F1 表示细胞壁；F2 表示细胞质内可溶性物质及液泡；F3 表示细胞器（除液泡）；圆括号内数值为不同细胞组分的分配比例（%）

Note: F1 means cell wall; F2 means intracytoplasmic soluble substance and vacuoles; F3 means organelle (except vacuoles); Numerical value in parenthesis means distribution ratio of different cell components.

部分锰含量只占总锰的 34.58%，随锰处理浓度的增加，细胞器中锰含量从 12.48% 降至 4.21%。

锰在茎中的含量分布及分配率见表 1。锰在茎中的分布规律和在根中的分布规律一致，随锰处理浓度的增加，细胞质、细胞壁和细胞器中的锰含量均增加；在茎中，细胞质中锰的绝对含量增加最大。从锰在茎中的分配率来看，随锰处理浓度的增加，水蓼茎中细胞质中锰的分配率增加，细胞壁中锰分配率降低，这有利于锰向叶片转运；细胞器中锰分配率也有所减少。

叶是水蓼累积锰的重要器官，从其含量分布看，锰在水蓼叶片中的分布规律与在根和茎中的分布规律一致，随锰处理浓度增加，各亚细胞组分锰含量都有所增加，且细胞质中锰绝对含量增加最大(表 1)。从叶片中锰的亚细胞分配率来看，细胞质可溶性部分（包括液泡）锰的比例最高，达 58.18%～65.64%，其次是细胞壁部分，其比例为 31.73%～36.34%，细胞器锰只占总锰的2.60%～5.48%。叶片中锰大部分分布在细胞质可溶性部分，可能是在其液泡中与某种配体结合存在。

2.1.2　Mn 在水蓼体内的化学结合形态　不同提取剂可提取不同形态的化合物，因此采用不同提取剂顺序性提取植物中不同成份可以判断金属在其组织中的化学结合形态。表 2 为不同提取剂顺序提取的各种化学形态 Mn 在水蓼根、茎和叶中的含量。

从表 2 可以看出，随着 Mn 处理浓度的增加，各形态 Mn 的绝对含量也增加。对照处理（9.1 μmol/L）和低浓度处理（500 μmol/L）时，水蓼根中的 Mn 以水提取态为主，分别为总 Mn 的 63.61% 和 47.31%；高浓度 Mn 处理（2 000 μmol/L）时，根中水提取态 Mn 含量大幅度降低，为全 Mn 含量的 31.52%，Mn 处理浓度达（5 000 μmol/L）时，水提取态 Mn 仅为总 Mn 的 29.76%。而盐酸提取态 Mn 和氯化钠提取态 Mn 含量比例均显著上升，提高幅度分别有 15.31 和 16.70 个百分点。

Mn 在水蓼茎中的化学形态以水提取态和氯化钠提取态为主。随着 Mn 处理浓度的增加，茎中水提取态 Mn 占总 Mn 的比例也逐渐增加，从对照处理时的 34.55% 增加至 5 000 μmol/L 时的 50.26%，在茎中，水提取态 Mn 比例的增加有利于 Mn 向地上部的运输；氯化钠提取态也有小幅度增加，提高幅度达 6.61 个百分点；其他提取态 Mn 的比例均有小幅度降低。

水蓼叶片中的 Mn 以水提取态、盐酸提取态和氯化钠提取态为主，随着 Mn 处理浓度的增加，水提取态 Mn 和盐酸提取态 Mn 占总 Mn 的比例也逐渐上升，盐酸提取态 Mn 上升了 8.08 个百分点，水提取态 Mn 也上升了 5.64 个百分点，其他提取态所占比例则均有不同幅度下降。这说明无论是低 Mn 还是高 Mn 处理下，Mn 在水蓼叶中

均以水溶性有机酸盐为主要形态存在，其次以草酸盐、果胶酸盐或与蛋白质结合形态形态存在。

2.2 水蓼对锰毒害的生理生化响应机制

2.2.1 不同锰处理浓度对叶片叶绿素含量的影响

由表 3 可见，Mn 处理对水蓼叶绿素 a、b 含量均有影响。随着锰处理浓度的升高，水蓼叶绿素 a、b 含量均呈下降趋势。但是与对照相比差异并不显著，只在锰浓度 > 5 000 μmol/L 时，叶绿素 a 含量与对照相比差异达显著 ($P = 0.05$)。

2.2.2 不同锰处理浓度对叶片细胞膜的影响

质膜透性是细胞膜受损的一种表现。细胞膜受损的伤害程度越大，植物的质膜透性也相应越大。

表 2 水蓼根、茎、叶各组织中各种化学提取态 Mn 的含量 (mg/kg FW)

Table 2 Concentrations of Mn in the chemical fractions of the fresh root、stem and leaf tissues of *Polygonum hydropiper* by successive extractions (mg/kg FW)

	Mn treatment μmol/L	F_E	F_W	F_{NaCl}	F_{HAc} (mg/kg FW)	F_{HCl}	F_R	Total
root	9.1	4.05±0.32 (7.45)	34.60±3.15 (63.61)	8.41±0.69 (15.46)	2.13±0.25 (3.92)	4.04±0.41 (7.43)	1.16±0.09 (2.13)	54.39±4.98
	500	38.32±7.16 (6.82)	265.77±23.59 (47.31)	150.27±7.13 (26.75)	31.39±4.03 (5.59)	66.28±7.96 (11.80)	9.78±1.11 (1.74)	561.82±52.38
	2000	104.45±29.87 (6.63)	496.69±42.18 (31.52)	478.56±19.69 (30.37)	153.30±14.87 (9.73)	320.08±32.49 (20.32)	22.46±2.56 (1.43)	1575.54±139.75
	5000	184.61±72.16 (6.76)	812.88±79.43 (29.76)	878.35±31.88 (32.16)	202.40±38.74 (7.41)	621.08±65.19 (22.74)	31.80±3.17 (1.16)	2731.11±250.42
stem	9.1	4.90±0.45 (10.84)	15.63±1.38 (34.55)	13.60±1.15 (30.06)	4.12±0.48 (9.11)	5.18±0.52 (11.46)	1.80±0.75 (3.98)	45.24±4.34
	500	8.69±9.08 (9.35)	34.56±3.57 (37.17)	30.37±3.06 (32.66)	8.02±0.74 (8.63)	9.18±1.06 (9.87)	2.16±0.19 (2.32)	92.99±10.25
	2000	45.50±4.73 (5.01)	439.44±40.57 (48.36)	322.04±27.88 (35.44)	62.50±6.09 (6.88)	28.38±3.07 (3.12)	10.80±1.24 (1.19)	908.65±90.66
	5000	83.55±8.17 (4.27)	983.74±88.16 (50.26)	7177.85±49.72 (36.67)	93.81±9.22 (4.79)	60.80±5.98 (3.11)	17.65±1.66 (0.90)	1957.40±134.28
leaf	9.1	4.16±0.38 (4.14)	38.76±4.01 (38.55)	24.23±2.31 (24.11)	10.82±1.26 (10.76)	20.77±1.98 (20.66)	1.80±0.11 (1.79)	100.53±10.28
	500	19.97±2.07 (3.51)	230.67±25.98 (40.52)	108.27±11.46 (19.02)	60.15±7.14 (10.56)	145.99±13.73 (25.64)	4.25±0.47 (0.75)	569.30±55.41
	2000	59.01±6.22 (3.14)	789.75±81.43 (42.08)	365.21±34.58 (19.46)	144.09±14.78 (7.68)	499.65±51.66 (26.62)	18.96±2.04 (1.01)	1876.68±180.78
	5000	104.40±10.74 (2.97)	1552.36±148.82 (44.19)	581.19±47.43 (16.54)	238.08±24.64 (6.78)	1009.68±99.76 (28.74)	27.50±3.11 (0.78)	3513.21±320.46

注：F_E 表示 80% 乙醇提取态，F_W 表示去离子水提取态，F_{NaCl} 表示 1 mol/L 氯化钠提取态，F_{HAc} 表示 2% 醋酸提取态，F_{HCl} 表示 0.6 mol/L 盐酸提取态，F_R 表示残余态；圆括号内数值为不同提取态内锰的分配比例 (%)

Note: F_E means 80% ethanol extractable Mn; F_W means deionized water extractable Mn; F_{NaCl} means 1 mol/L NaCl extractable Mn; F_{HAc} means 2% acetic acid extractable Mn; F_{HCl} 0.6 mol/L HCl extractable Mn; F_R means residual Mn; Numerical value in parenthesis means distribution ratio of different extractable Mn .

表 3 锰胁迫下水蓼叶片各生理生化指标的含量

Table 3 Concentration of different physiology and biochemical index of leaves of *Polygonum hydropiper* on Mn stress

Mn treatment (μmol/L)	Chla (mg/g FW)	Chlb (mg/g FW)	Leakage (%)	Protein content (mg/g FW)	SOD activity (U/g FW)	POD activity (U/g FW)	CAT activity (U/g FW)
9.1 (CK)	1.30±0.04a	0.42±0.08a	16.77±1.96a	9.96±0.62a	49.62±4.43a	93.34±7.80a	30.88±2.50a
500	1.32±0.11a	0.45±0.07a	18.02±2.70a	6.01±0.74c	69.18±5.72a	101.21±7.97a	33.66±3.13a
2000	1.20±0.13a	0.41±0.06a	19.06±1.41a	7.79±0.91b	96.84±8.07b	133.35±13.20a	30.25±2.77a
5000	1.14±0.06ab	0.34±0.03a	20.01±0.74ab	8.26±0.45b	145.99±10.48c	308.03±36.50b	32.57±3.17a
8000	0.92±0.04b	0.30±0.05a	23.04±1.73b	9.17±1.04ab	244.10±26.65d	498.75±44.60c	31.87±2.83a

注：不同字母表示差异显著 ($P = 0.05$)。Different letters within columns indicate significantly different ($P = 0.05$)

随着 Mn 处理浓度的升高，水蓼叶片的质膜透性有逐渐增加的趋势（表 3）。当 Mn 处理浓度≤5 000 μmol/L时，与对照和其它处理差异不显著（$P = 0.05$），表明 Mn 浓度达 50 000 μmol/L时还没有使细胞膜严重受损。当 Mn 处理浓度为 8 000 μmol/L, 与对照相比质膜透性差异显著（$P = 0.05$），表明高浓度的 Mn 已对叶片产生了明显的损害。

2.2.3　不同锰处理浓度对叶片可溶性蛋白含量的影响　逆境胁迫可引起植物基因表达的变化，使某些正常蛋白质合成受阻，逆境蛋白（stress protein）被诱导合成，使植物在代谢和结构上发生调整，增强抵御不良环境的能力。从表 3 可以看出，水蓼在对照锰处理（9.1μmol/L）时，可溶性蛋白含量最高。与对照相比，随锰浓度的增加，水蓼叶片的可溶性蛋白含量明显减少，在 500 μmol/L时，其可溶性蛋白含量显著减少，随着锰处理浓度的升高，其可溶性蛋白含量有所上升，当 Mn 处理浓度为 8 000 μmol/L时与对照相比差异不显著（$P = 0.05$）。

2.2.4　不同锰处理浓度对叶片抗氧化酶的影响

随供锰水平的提高，水蓼叶片的 SOD 酶活性呈明显的增加趋势，当锰处理 > 500 μmol/L时，与对照相比 SOD 酶活性达显著（$P = 0.05$）（表 3）。随供锰水平的提高，水蓼叶片的 POD 酶活性呈明显的增加趋势，当锰处理≥5 000 μmol/L时，与对照相比 POD 酶活性达显著（$P = 0.05$）（表 3）。随锰处理水平的增加，水蓼叶片的 CAT 酶活性变化不明显，各处理间，CAT 酶活性均不显著（$P = 0.05$）。

3　讨论

3.1　Mn 在水蓼细胞内的分布

水蓼能富集高浓度的 Mn 而不受毒害，其体内必然存在某种解毒机制。一般认为重金属离子在细胞内的区隔化是植物内部解毒的重要途径之一。已有的研究表明：细胞壁能束缚大量金属离子，避免这些离子的跨膜运输和向细胞内的迁移，从而降低了原生质部分的金属离子浓度，使植物免受毒害（杨居荣等，1995）。

不同 Mn 浓度处理下，在水蓼根细胞壁的中的Mn 含量占总量的 25.36%～61.22%（表 1）。根细胞壁具有大量的阳离子配位基团，是重金属的重要累积部位，也是锰结合的重要部位。根细胞壁锰分配比例的增加，细胞可溶性部分锰分配比例减少，部分地限制了锰向地上部分运输，这可能是水蓼耐锰的一种机制；但由于水蓼叶锰的超积累特性及锰易从地下部分向地上转移的特性，仍有大量的锰运输到茎叶中。锰在茎细胞质中的含量较高，细胞壁中锰分配率降低，这有利于锰向叶片转运。

除细胞壁之外，液泡是植物细胞原生质内部的另一个重金属离子的贮存库。当细胞壁上能结合金属离子的结合点达到饱和时，重金属离子必然透过细胞膜进入原生质中。前人的研究已发现 Ni 的超积累植物庭荠属的 *A. serpyllifolium* 细胞中，72% 的 Ni 分布在液泡中（Nishizono 等，1987），Zn 超积累植物遏蓝菜属的 *T. caerulescens* 的叶片组织在低 Zn 供应（10 μmol/L）时，液泡与质外体中的 Zn 浓度几乎相等，而当高 Zn 供应（100 μmol/L）时，Zn 在液泡中的分布明显高于质外体（Vazquez 等，1992）。

从叶片中锰的亚细胞分配率来看，细胞质可溶性部分（包括液泡）锰的含量最高，占总锰的 58.18%～65.64%（表 1）。由于成熟细胞 95%的体积都是液泡（Memon and Yatazawa，1984），因此可以推测叶片中大部分都累积在液泡中。植物细胞器具有很多重要功能，随锰处理浓度的增加细胞器中锰分配率降低，这可能是水蓼对高锰的一种适应性保护机制，以维持细胞器的正常功能。细胞壁在叶片累积锰的过程中也起了相当的作用。

3.2　水蓼细胞内 Mn 的化学形态

重金属的形态是植物累积解毒的重要机制之一。许多研究者对植物体内重金属离子存在的化学形态的研究表明重金属离子在细胞内不能以游离态大量存在。在超富集植物体内，85%～90%的重金属离子是与极性化合物相结合的，这些极性化合物一般是水溶性的、醇溶性的和酸溶性的低分子量的金属螯合物，它们含有大量的金属离子的配位基团，这些金属配位体在维持细胞金属离子的微量稳态方面起着重要作用（Baker and Brooks，1989；Rauser，1999）。

随处理浓度增加，水蓼根中 Mn 由水提取态向盐酸提取态和氯化钠提取态转化（表 2），说

明根细胞壁结合的 Mn 含量随锰处理浓度增加而增加，这与 Mn 在水蓼根亚细胞内的分布结果一致（表 1）。锰在根中与细胞壁结合导致锰向地上部分转移能力的减弱，这可能是水蓼耐 Mn 的机制之一，但由于细胞壁容量有限以及 Mn 易向地上部分迁移的特性，仍有大量的锰转移到地上部分后累积在叶中。在茎中，水提取态 Mn 含量达总锰的 34.55%～50.26%，且随处理浓度的增加其水提取态 Mn 比例增加，高水提取态的 Mn 有利于 Mn 在木质部的向上运输，这与水蓼茎亚细胞内的分布也是吻合的（表 1）。在水蓼的叶片中，水提取态 Mn 占总锰的 38.55%～44.19%；对其他锰富集植物叶片研究表明，54%～77% 的 Mn 可被水提取（Memon and Yatazawa，1982），去离子水主要提取与水溶性物质结合的部分如水溶性有机酸盐，因此水蓼叶片中大部分 Mn 可能与有机酸结合。在水蓼的叶片中，随着锰处理浓度的增加，盐酸提取态锰占总锰的比例不断增加，盐酸主要提取草酸盐，即草酸锰占叶片总锰 20.66%～28.74%，说明水蓼叶中有相当量是以草酸锰形态存在。在 Memon and Yatazawa（1984）与 Bidwell 等（2002）的研究中都提出草酸是 Mn 的最终受体，徐向华（2006）的研究中提出商陆叶片中的 Mn 以 +2 价为主，草酸锰是其叶片中锰的主要形态。

3.3　水蓼对锰的生理生化响应

本研究中，在高 Mn 浓度（8000 μmol/L）处理下，成熟叶片的叶绿素含量下降，因此影响干物质的合成，这与高锰浓度处理下水蓼地上部分生物量减少的结果相一致（王华等，2007）。叶绿素下降的原因：一是重金属抑制原叶绿素酸醋还原酶合成；二是影响氨基酮戊酸的合成（Stobart 等，1985）。另外，Mg 和 Fe 是叶绿素的重要组分，在叶绿素的合成和电子传递过程中发挥重要作用，高锰对 Fe 吸收的抑制减少了叶绿素的合成。

质膜是控制离子进出细胞的重要屏障，在接触过量金属离子时维持质膜结构完整性的能力是决定植物耐性强弱的关键因素。重金属离子过量将导致质膜透性改变，离子泄露增加。本实验的研究结果表明，随供锰浓度的提高，质膜透性有增加趋势，在锰浓度处理≤5 000 μmol/L时差异不显著（$P=0.05$），说明水蓼还没有受到锰的严重危害。

由于活性氧自由基的毒害作用，植物自身会存在一种保护系统来清除产生的活性氧自由基，SOD、POD、CAT 是抗氧化酶防御系统中的重要保护酶，能够对自由基和过氧化物起清除作用。SOD 作为超氧自由基清除剂，其活性高低与植物抗性大小有一定的相关性。当外来胁迫（如重金属）导致大量活性氧产生时，它能及时有效清除自由基，保护细胞免受氧化胁迫的伤害（Cakmak and Horst，1991）；但当活性氧的增加远远超过正常的歧化能力时，细胞内多种功能酶及膜系统遭到破坏，生理代谢紊乱，SOD 活性反而受到抑制而下降（严重玲等，1997）。本研究结果表明，随锰处理浓度的提高，SOD 活性增加，说明 SOD 在清除 $O_2^{\cdot -}$ 具有重要作用。

研究表明 POD 活性的高低与植物的耐锰能力关系密切（Gonzales 等，1998；Fecht-Christoffers 等，2003）。从本试验的结果来看，增加锰处理浓度 POD 活性升高，表明 POD 在降低氧化胁迫方面发挥重要作用，许多研究表明，植物体内 CAT 随着环境胁迫的加重而下降（Madgava and Sresty，2000；Schutzenubel 等，2002；Al-aghabary 等，2004）。但是有关锰胁迫对 CAT 活性的影响，报道的结果不尽一致。高锰胁迫使大麦和圆叶薄荷中的 CAT 活性显著上升（Candan and Tarhan，2003；Demirevska-Kepova 等，2004）。Nable 等（1988）以烟草为材料的研究中，发现不同锰水平下 CAT 活性无显著差异。在本试验中，不同锰处理下 CAT 活性亦无显著差异，表明在水蓼中 CAT 可能不是锰胁迫下清除 H_2O_2 的关键酶。高锰处理对 CAT 的影响在不同的研究者之间存在差异，其原因可能归因于植物种间的反应不同，也可能与取样时间和组织不同有关。

许多逆境条件（如高光强、干旱、重金属、盐渍、高温、冷冻、营养元素缺乏）及衰老等都会导致植物细胞内自由基的产生量增多和自由基清除能力的改变。轻微逆境能刺激植物保护酶系统活性的提高，而提高植物对逆境的抵抗能力。保护酶系统对自由基的清除能力的变化可能是植物抗性的共同机制。本试验结果表明，随供锰水平的提高，水蓼叶片 SOD 和 POD 活性提高，保

护酶活性的提高又可清除活性氧自由基，这可能是水蓼耐高锰和累积锰的一种生理响应机制。

〔参 考 文 献〕

中国科学院上海植物生理研究所和上海市植物生理学会，1999．**现代植物生理学实验指南**［M］．**北京：科学出版社**，302—303

Al-aghabary K，Zhu ZJ，Shi QH，2004．Influence of silicon supply on chlorophyll content，chlorophyll fluorescence and antioxidative enzyme activities in tomato plants under salt stress［J］．*J Plant Nutrition*，**27**（12）：2101—2115

Baker AJM，Brooks RR，1989．Terrestrial higher plants which hyperaccumulate metallic elements-a review of their distribution，ecology and phytochemistry［J］．*Biorecovery*，**1**：81—126

Bidwell SD，Woodrow IE，Batianoff GN *et al.*，2002．Hyperaccumulation of manganese in the rainforest tree *Austromyrtus bidwillii*（Myrtaceae）from Queensland，Australia［J］．*Functional Plant Biol*，**29**：899—905

Bradford MM，1976．A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dry binding［J］．*Anal Biochem*，**72**：248—254

Cakmak I，Horst WJ，1991．Effect of aluminum on lipid peroxidation，superoxide dismutase，catalase and peroxidase activites in root tip of soybean［J］．*Physiol Plantarum*，**83**：463—468

Candan N，Tarhan L，2003．The correlation between antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation levels in Mentha pulegium organs grown in Ca^{2+}，Mg^{2+}，Cu^{2+}，Zn^{2+} and Mn^{2+} stress conditions［J］．*Plant Sci*，**165**：769—776

Cao X，Ma LQ，Tu C，2004．Antioxidative responses to arsenic in the arsenic-hyperaccumulator Chinese brake fern（*Pteris vittata* L.）［J］．*Environmenta Pollution*，**128**：317—325

Cho UH，Park JO，1999．Distribution and phytotoxicity of *Cadmium* in tomato seedings［J］．*J Biol*，**42**（1）：49—56

Demirevska-Kepova K，Simova-Stoilova L，Stoyanova Z *et al.*，2004．Biochemical changes in barley plants after excess supply of copper and manganese［J］．*Environ Exp Bot*，**52**：253—266

Fecht-Christoffers MM，Maier P，Horst W，2003．Apoplastic peroxidases and ascorbate are involved in manganese toxicity and tolerance of *Vigna unguiculata*［J］．*Plant Physiol*，**117**：237—244

Gabbrielli R，Panddfini T，Verganano O *et al.*，1990．Comparison of two serpentinite species with different nickel tolerance strategies［J］．*Plant and Soil*，**122**：271—277

Gonzales A，Steffwn KL，Lynch JP，1998．Light and excess manganese［J］．*Plant Physiol*，**118**：493—504

Madgava Rao KV，Sresty TVS，2000．Antioxidative parameters in the seedlings of pigeonpea（*Cajanus cajan* L．Millspaugh）in response to Zn and Ni stresses［J］．*Plant Sci*，**157**：113—128

Memon AR，Yatazawa M，1982．Chemical nature of manganese in the leaves of manganese accumulator plants［J］．*Soil Sci Plant Nutr*，**28**：401—412

Memon AR，Yatazawa M，1984．Nature of manganese complexes in Mn accumulator plant-*Acanthopanax sciadophylloides*［J］．*J Plant Nutrition*，**7**：961—974

Nable RO，Houtz RL，Cheniae GM，1988．Early inhibition of photosynthesis during development of Mn toxicity in tobacco［J］．*Plant Physiol*，**86**：1136—1142

Nishizono H，Ichikawa S，Suzike S *et al.*，1987．The role of the root cell wall in the heavy metal tolerance of *Athyrium yokoscense*［J］．*Plant Soil*，**101**：15—20

Rauser WE，1999．Structure and function of metal chelators produced by plants-the case for organic acids，amino acids，phytin and metallothioneins［J］．*Cell Biochemistry and Biophysics*，**31**：19—48

Schutzenubel C，Nikolova P，Rudolf C *et al.*，2002．Cadium and H_2O_2-induced oxidative stress in *Populus canescens* roots［J］．*Plant Physiol Biochem*，**40**：577—584

Stobart AK，Grifiths W，Bukhari IA *et al.*，1985．The effect of Cd^{2+} on the biosynthesis of chlorophyll in leaves of barley［J］．*Plant Physiol*，**63**：293—298

Vazquez MD，Barcelo J，Poschenrieder C *et al.*，1992．Localization of zinc and cadmium in *Thlaspi caerulescens*（Brassicacease），a metallophyte that can hyperaccumulate both metals［J］．*J Plant Physiol*，**140**：350—355

Wang H（**王华**），Tang SM（**唐树梅**），Liao XJ（**廖香俊**）*et al.*，2007．A new manganese-hyperaccumulator：*Polygonum hydropiper* L．［J］．*Ecology and Environment*（**生态环境**），**16**（3）：830—834

Weigel HJ，Jager HJ，1980．Subcellutar distribution and chemical form of *Cadmium* in bean plant［J］．*Plant Physiol*，**65**：480—482

Xu JL（**许嘉琳**），Bao ZP（**鲍子平**），Yang JR（**杨居荣**）*et al.*，1991．Chemical forms of Pb，Cd and Cu in crops［J］．*Chin J Appl Ecol*（**应用生态学报**），**2**（3）：244—248

Xu XH（**徐向华**），2006．Study on absorption and accumulation mechanisms of manganese in hyperaccumulator *Phytolacca acinosa* Roxb．（Phytolaccaceae）［D］．Master Degree Dissertation of Zhe Jiang University（**浙江大学博士学位论文**）

Yan CL（**严重玲**），Fu SZ（**付舜珍**），Fang ZH（**方重华**）*et al.*，1997．Effects of Hg，Cd and their interaction on chlorophyll content and antioxidant enzyme systems in leaves of tobacco［J］．*Acta Phytoecol Sin*（**植物生态学报**），**21**（5）：468—473

Yang JR（**杨居荣**），He JQ（**贺建群**），Jiang WR（**蒋婉茹**），1995．Effect of Cd pollution on the physiology and biochemistry of plant［J］．*Agro-Environmental Protection*（**农业环境保护**），**14**（5）：193—197